



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

Desenvolvimento tecnológico e avaliação biológica (*in vitro*) de produto seco por aspersão obtido a partir da solução extrativa de *Hyptis pectinata* (L.) Poit (Lamiaceae) (sambacaitá)

Anderson Ribeiro dos Santos

SÃO CRISTÓVÃO- SE

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

Desenvolvimento tecnológico e avaliação biológica (*in vitro*) de produto seco por aspersão obtido a partir da solução extrativa de *Hyptis pectinata* (L.) Poit (Lamiaceae) (sambacaitá)

Anderson Ribeiro dos Santos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Sergipe como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Dr. Francilene Amaral da Silva

SÃO CRISTÓVÃO - SE

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

Desenvolvimento tecnológico e avaliação biológica (*in vitro*) de produto seco por aspersão obtido a partir da solução extrativa de *Hyptis pectinata* (L.) Poit (Lamiaceae) (sambacaitá)

Anderson Ribeiro dos Santos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Sergipe como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: ____/____/____

Orientador (a): _____

1º Examinador (a): _____

2º Examinador (a): _____

Sumário

Resumo	6
Abstract	7
1. Introdução.....	8
2. Revisão da literatura.....	11
2.1 Família Lamiaceae.....	11
2.2 Gênero <i>Hyptis</i>	11
2.2.1 Principais atividades Farmacológica e constituintes químicos descritos na literatura para o gênero <i>Hyptis</i>	12
2.3 <i>Hyptis pectinata</i>	15
2.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	17
2.5. Espécies redox-ativas, estresse oxidativo e defesas antioxidantes.....	19
2.6. Produtos Naturais e atividade antimicrobiana.....	20
3. Objetivos.....	22
3.1. Objetivo geral.....	22
3.2 Objetivos específicos.....	22
4. Material e métodos.....	23
4.1. Material vegetal.....	23
4.2. Preparação da solução extrativa de <i>Hyptis pectinata</i>	23
4.3. Preparação do extrato seco por aspersão em spray-dried.....	23
4.4. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massas.....	23
4.4.1. Preparo das amostras para análise em CLAE-EM.....	23
4.4.2. Condições e especificações das análises por CLAE-EM.....	24
4.5. Desenvolvimento e validação de Metodologia analítica para quantificação do ESHP.....	25
4.5.1. Linearidade e Curva padrão.....	25
4.5.2. Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ).....	25

4.5.3. Precisão.....	25
4.5.4. Exatidão.....	25
4.5.5. Robustez.....	26
4.6. Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	26
4.6.1. Potencial Antioxidante Total (TRAP) e Reatividade Antioxidante Total (TAR).....	26
4.6.2. Atividade scavenger de radicais hidroxila do ESHP (\bullet OH).....	27
4.6.3. Avaliação do potencial antioxidante do ESHP na inibição de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico <i>in vitro</i> (TBARS).....	27
4.6.4. Avaliação do potencial antioxidante do ESHP na remoção de óxido nítrico <i>in vitro</i> (NO).....	28
4.7. Avaliação da atividade antimicrobiana.....	29
4.7.1. Micro-organismos.....	29
4.7.2. Método de Difusão em Disco.....	29
4.7.3. Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	30
4.8. Análise Estatística.....	30
5. Resultados.....	31
5.1. Análise da SEHP e do ESHP por CLAE.....	31
5.2. Teor de polifenóis no ESHP.....	31
5.3. Validação da metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência.....	34
5.4. Resultados dos testes de atividade antioxidante para o ESHP...35	
5.4.1 . Potencial Antioxidante Total (TRAP) e Reatividade Antioxidante Total (TAR).....	35
5.4.2. Ensaio da atividade scavenger de radicais hidroxila <i>in vitro</i> (\bullet OH).....	37
5.4.3. Avaliação do potencial antioxidante do ESHP na remoção de óxido nítrico <i>in vitro</i>	38
5.4.4. Avaliação do potencial antioxidante da <i>H. pectinata</i> na remoção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico <i>in vitro</i> (TBARS).....	39
5.5. Resultado dos testes de atividade antimicrobiana do ESHP <i>in vitro</i>	40

6. Conclusões.....	43
7. Referências.....	44
8. Anexos.....	50
8.1. Anexo 1: Trabalho apresentado no Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil em 16 a 19 de setembro de 2014.....	50
8.2. Anexo 2: Trabalho apresentado na Reunião Anual e Exposição da American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS) em San Diego no período de 2 a 6 de novembro de 2014.....	51

Resumo

Introdução: A espécie *Hyptis pectinata* L. Poit (Lamiaceae) é popularmente conhecida no nordeste brasileiro como sambacaitá ou canudinho, sendo utilizada popularmente na região de Sergipe e Alagoas, sob a forma de chá, para o tratamento de distúrbios gastrointestinais, inflamação, condições dolorosas orofaciais e cicatrização de feridas. A literatura relata para o extrato aquoso das folhas baixa toxicidade, hepatoproteção, efeito antiedematogênico, antinociceptivo e antioxidante. Paralelamente, para o desenvolvimento de um produto tecnologicamente viável, o maior obstáculo reside na dificuldade da definição de critérios para avaliação da qualidade da matéria-prima vegetal e produtos derivados. Neste contexto, o presente trabalho objetiva o desenvolvimento de produto seco por nebulização a partir de uma solução extrativa padronizada de *H. pectinata*, bem como a avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana *in vitro*. **Métodos:** A solução extrativa (SEH) foi preparada por decocção das folhas de *H. pectinata* (L.) em uma proporção planta:solvente de 1,5% (m/v), por 15 minutos. A SEH foi seca por aspersão e o produto resultante (ESHP) quantificado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (CLAE/EM). Após a padronização o ESHP foi investigado em modelo de atividade antioxidante *in vitro* e atividade antimicrobiana *in vitro*. **Resultados e Discussão:** O método por CLAE/EM mostrou excelente desempenho na separação dos picos observando-se excelente repetibilidade (RSD <2,0%) e precisão (rutina>95. %). A curva padrão para rotina foi linear com coeficiente de correlação superior a 0,9992. Além da rotina, foram detectados dois outros constituintes os quais foram identificados com base em seus espectros de massa no tempo de retenção e tempos de varredura completa e em comparação com os dados da literatura disponíveis. Nas concentrações de 0,1; 1; 10 e 100 µg/mL foi observado que o ESHP inibiu a quantidade de TBARS formada, de maneira semelhante ou superior ao composto Trolox (padrão antioxidante). Além disso, o ESHP também reduziu a produção dos radicais hidroxila, assim como a produção de óxido nítrico de forma semelhante ou superior ao Controle. Os resultados do teste de difusão em disco mostraram diferença significativa quanto à sensibilidade dos micro-organismos frente ao ESHP (p<0,05). A Concentração Inibitória Mínima (CIM) do ESHP (312 µg/ mL) apresentou o melhor desempenho para inibir o crescimento das cepas Gram-positivas. De acordo com os dados levantados por este estudo, *H. pectinata* apresentou propriedade antioxidante *in vitro* por diferentes mecanismos e atividade antibacteriana para cepas Gram-positivas, podendo tornar-se alternativa terapêutica tanto para o uso popular quanto para a indústria farmacêutica.

Palavras-chave: *Hyptis pectinata*; atividade antioxidante; atividade antimicrobiana

Abstract

Introduction: The *Hyptis pectinata* L. Poit (Lamiaceae) species is well-known in northeast Brazil as sambacaitá or straw, being used around Sergipe and Alagoas, in the form of tea, for the treatment of gastrointestinal disorders, inflammation, orofacial pain conditions and wound healing. The literature reports low toxicity for the aqueous extract of leaves, besides hepatoprotection and effects antiedematogenic antinociceptive and antioxidant. In parallel to the development of a technologically viable product, the biggest obstacle is the difficulty of defining criteria for evaluating the quality of vegetable raw materials and related products. In this context, this work intent theelaboration of dry product by spraying from a standard extraction solution *H. pectinata* as well as evaluating the antioxidant and antimicrobial activity.**Methods:**The extraction solution (SEH) was prepared by decoction of leaves of *H. pectinata* (L) on a plant scale: solvent of 1.5% (w / v) for 15 minutes. The SEH was spray dried and the resulting product (ESHP) quantified by High Performance Liquid Chromatography Efficiency coupled to Mass Spectrometry (HPLC / MS). After standardizing the ESHP was investigated in model in vitro antioxidant activity and antimicrobial activity *in vitro*.**Results and discussion:** The method by HPLC/MS showed excellent performance in the separation of the peaks observing excellent repeatability (RSD <2.0%) and accuracy (rutin>95%). The standard curve for routine was linear with a correlation coefficient greater than 0.9992. In addition to the routine, two other constituents were detected which were identified based on their mass spectra in full scan and retention times of time and compared with literature data available. The concentrations 0.1; 1; 10 and 100 mg/mL were observed that the ESHP inhibited the amount of TBARS formed in a manner similar or superior to compound Trolox (an antioxidant pattern). Furthermore, the ESHP also reduced production of hydroxyl radical as well as nitric oxide production similar or superior to control. The results of disk diffusion test showed a significant difference in the sensitivity of microorganisms against the ESHP (p <0.05). The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of ESHP (312 mg / mL) showed the best performance to inhibit the growth of Gram-positive strains. According to the data collected by this study, *H. pectinata* presented antioxidant activity in vitro by different mechanisms and antibacterial activity for Gram-positive strains may become alternative therapy for both popular use and for the pharmaceutical industry.

Keywords: *Hyptis pectinata*; antioxidant activity; antimicrobial activity

1. Introdução

A Organização Mundial da Saúde (OMS) reporta que em torno de 85% da população nos países em via de desenvolvimento utilizam práticas alternativas em saúde, sendo que a maior parcela recorre às plantas medicinais. Estima-se que, no Brasil cerca de 20% da população é responsável por 63% do consumo de medicamentos sintéticos e a outra parcela da população encontra nas práticas tradicionais, como plantas medicinais, a única fonte de recursos terapêuticos (FOGLIO *et al.*, 2006).

O mercado mundial de fitoterápicos gira em torno de aproximadamente 22 bilhões de dólares por ano. Neste cenário, o Brasil, apesar de deter cerca de um terço da flora mundial, não apresenta uma atuação destacada na produção e desenvolvimento de fitoterápicos (BLUMENTHAL, 2000), tendo hoje um fitoterápico baseado na flora brasileira, onde todas as fases de desenvolvimento ocorreram em território nacional. Dos fitoterápicos registrados na Agência Nacional de Vigilância Sanitária, uma pequena parte é oriunda de espécies nativas, o que demonstra necessidade de investimentos em pesquisas com espécies da flora nacional (MIOTO, 2010).

A situação é ainda mais alarmante em quando se trata da região Nordeste, que embora possua uma alta diversidade de espécies vegetais, com potencial econômico tanto para o fornecimento de matéria-prima vegetal de qualidade como para o desenvolvimento de novos medicamentos, apresenta poucas empresas na área, a maioria com nível mínimo de pesquisa sendo a comercialização dos produtos, em grande parte, voltada para a própria região.

O uso dos fitoterápicos na medicina não tem a finalidade de substituir medicamentos sintéticos mas sim aumentar o leque de opções terapêuticas dos profissionais de saúde no cuidado ao paciente, disponibilizando assim medicamentos equivalentes, igualmente registrados, de custo mais acessível e/ou com espectro de ação mais apropriado, com uso terapêutico complementar ou alternativo aos medicamentos existentes (FINTELMANN; WEISS, 2010).

O desenvolvimento e a utilização segura de um medicamento fitoterápico esbarram, inicialmente, na dificuldade da definição de critérios para avaliação da

qualidade da matéria prima vegetal e produtos derivados. A problemática no estabelecimento dessas especificações reside no fato de que a constituição química e as características da matéria-prima dependem tanto de fatores agrônômicos quanto tecnológicos, relacionados aos procedimentos empregados na transformação de uma droga vegetal em um medicamento. Tais condições dificultam a caracterização da droga vegetal, podendo suas propriedades variar de acordo com a origem e o processamento do vegetal (LIST & SCHMDT, 1989; MIGLIATO et al., 2007).

Apesar das dificuldades, há um consenso mundial da necessidade de se estabelecer métodos e parâmetros que permitam avaliar a qualidade de matérias-primas vegetais e fitoterápicas e, nesse sentido, várias diretrizes relacionadas às boas práticas agrônômicas, controle de qualidade e registro de produtos de origem vegetal vem sendo publicados (WORLD, 1996, 1998; FDA, 2000, BRASIL, 2014). Além disso, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicas, aprovada por meio do Decreto Presidencial Nº. 5.813, de 22 de junho de 2006, veio incentivar a utilização e o desenvolvimento de novos fitoterápicos através da criação do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicas-PNPMF que visa ampliar a lista de fitoterápicos oferecidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) de forma a fomentar o desenvolvimento sustentável da cadeia produtiva de medicamentos no Brasil.

No entanto, poucas são as espécies vegetais que apresentam, na literatura, especificações para avaliação da qualidade da matéria-prima vegetal, bem como registro de métodos analíticos validados que possam ser utilizados para a quantificação de marcadores químicos, o que é fundamental para garantia da eficácia e segurança dos produtos derivados. Na verdade, considerando a imensa variedade da flora brasileira, poucas são as espécies com atividade biológica comprovada, sendo a maioria utilizada pela população de forma bastante empírica (saber tradicional), o que significa um potencial terapêutico ainda a ser descoberto (YUNES et al., 2001).

Outra etapa bastante difícil é a transformação da matéria-prima vegetal em uma forma farmacêutica padronizada que possa ser utilizada com eficácia e segurança pela população (CUNHA et al., 2009). Considerando todos os benefícios terapêuticos das plantas medicinais, a necessidade de produção de um medicamento fitoterápico pode ser justificada pelos benefícios ao paciente, destacando, a conveniência, a

exatidão de dosagem, a biodisponibilidade e a estabilidade além de preços mais acessíveis.

A secagem é uma das operações mais frequentes na produção de medicamentos e, é empregada para a obtenção de pós e grânulos. O objetivo principal da secagem na área farmacêutica é a retirada da água, a qual é responsável por proporcionar um meio propício à reações químicas, fenômenos físicos e crescimento de micro-organismos (DE SOUZA *et al.*, 2006a).

O produto seco por aspersão é uma forma intermediária que pode ser utilizado para a elaboração de várias formas farmacêuticas, entre suas principais vantagens destaca-se a maior estabilidade dos constituintes químicos, facilidade de manipulação e exatidão de dosagem, características estas bastantes favoráveis à elaboração de um medicamento (DE SOUZA *et al.*, 2006b).

Hyptis pectinata (L.) Poit (Lamiaceae), pertence ao gênero *Hyptis* o qual é constituído por mais de 350 espécies e que exibe uma grande diversidade morfológica e de característica aromática (HARLEY, 1998; SEPTIMIO, 1994). É uma planta odorífera que se desenvolve de forma selvagem ou cultivada em volta de residências nos estados de Alagoas e Sergipe sendo conhecida popularmente como “sambacaitá” ou “canudinho”. Utilizada pelas comunidades tradicionais como anti-inflamatória (MALAN *et al.*, 1988), pesquisas atestaram que o extrato aquoso das folhas possui efeito antiedematogênico e antinociceptivo (BISPO *et al.*, 2001; LISBOA *et al.*, 2006), além da atividade antimicrobiana do óleo essencial. O uso popular e as atividades biológicas descritas na literatura fazem desta espécie uma matéria-prima potencial à pesquisa e desenvolvimento de insumos para obtenção de fitoterápicos. Para isto torna-se necessário o estabelecimento de critérios de qualidade, segurança e eficácia a fim de estabelecer seu uso correto em seres humanos. Neste sentido, o presente trabalho visa desenvolver um produto seco (padronizado) por nebulização contendo *Hyptis pectinata* e investigar a atividade antioxidante e antimicrobiana *in vitro* agregando, assim, valor econômico à espécie por meio da melhoria dos parâmetros tecnológicos e de estabilidade.

2. Revisão da Literatura

2.1 Família Lamiaceae

A família Lamiaceae é constituída de ervas, arbustos e árvores, com ramos geralmente quadrangulares. Essa família possui distribuição cosmopolita, sendo o maior centro de dispersão a região do Mediterrâneo. Inclui cerca de 300 gêneros e 7500 espécies sendo que, no Brasil ocorrem 26 gêneros e cerca de 350 espécies (Souza & Lorenzi, 2005; PORTE; GODOY, 2001).

De acordo com sistema Angiosperm Phylogeny Group III (2009), a família Lamiaceae está inserida no clado Euasteridae I, grupo Lamiídeas e ordem Lamiales, apresentando sete subfamílias. Possuem folhas geralmente opostas espiraladas, simples, as vezes lobuladas ou dessecadas, ou pinadas ou palmadas, bordas lisas a serrada e com estípulas ausentes (JUDD *et al.*, 1999).

Muitas espécies são utilizadas como condimentos em culinária devido ao aroma e sabor que conferem aos alimentos, apresentam grande variedade de metabólitos secundários como substâncias derivadas da via do acetato, do ácido chiquímico bem como da biossíntese mista (MENEZES, 1994). Muitas plantas são ricas em óleos essenciais destinados às indústrias na produção de fármacos, perfumes e cosméticos, como lavanda (*Lavandula angustifolia*) e boldo-brasileiro (*Plectranthus barbatus*). Algumas espécies também são utilizadas como plantas ornamentais, por exemplo: sálvia (*Salvia splendens*) (SOUZA; LORENZI, 2012).

2.2 Gênero *Hyptis*

Hyptis Jacq. É um gênero que está inserido no grande grupo das dicotiledôneas e família Lamiaceae (Labiatae), tem ampla distribuição e possui em torno de 350 espécies espalhadas principalmente nas regiões tropicais da América e África. Este gênero é composto principalmente por ervas, arbustos e subarbustos e, raramente árvores pequenas. Encontrado com mais facilidade nos cerrados brasileiros e mais especificamente no estado de Minas Gerais. São espécies aromáticas e quase que exclusivamente neotropicais, pois, se distribuem desde o sul do Estados Unidos até a Argentina (BORDIGNON, 1990; COUTINHO, 2009).

Segundo Falcão (2003), algumas espécies estudadas do gênero *Hyptis* apresentam substâncias num padrão semelhante ao da família a qual pertence, de forma que predominam metabólitos secundários da via do acetato e do ácido mevalônico, mas pode-se encontrar também substâncias de origem mista e derivados do ácido chiquímico.

2.2.1 Principais atividades Farmacológica e constituintes químicos descritos na literatura para o gênero *Hyptis*

Numa breve revisão sobre o gênero *Hyptis*, utilizando o banco de dados da CAPES, foi possível observar as principais atividades farmacológicas e constituintes químicos para o óleo essencial (Quadro 1) e extrato aquoso (Quadro 2) nas diferentes espécies do gênero.

QUADRO 1. Principais atividades e compostos químicos encontrados em óleos essenciais das diferentes espécies de *Hyptis*.

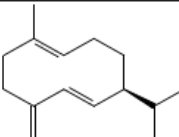
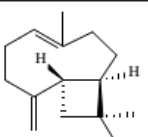
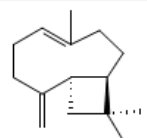
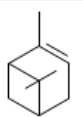
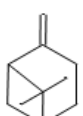
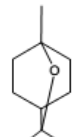
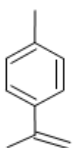
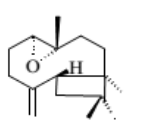
Espécies	Atividades	Metabólitos identificados	Referências
<i>H. pectinata</i>	Anti-inflamatória; Antinociceptiva; Antimicrobiana; Larvícida;	Cariofileno; oxido de cariofileno; calamusenona	Raimundo et al., 2011; Nascimento et al., 2008; Silva et al., 2008;
<i>H. fruticosa</i>	Anti-inflamatória e antioxidante; Larvícida; Hipotensor; Antinociceptivo;	Cineol; espatulenol; cariofileno; biciclogermacreno; cânfora; pineno;	Andrade et al., 2010; Silva et al., 2008; Santos et al., 2007; Menezes et al., 2007;
<i>H. suaveolens</i> <i>Poit.</i>	Antioxidante; Antifúngica; inseticida; repelente; Antibacteriana;	Eucaliptol, elemeno, betapineno, careno, betacariofileno, sabineno; germacreno; terpinoleno;	Moreira et al., 2010; Ilboudo et al., 2010; Tripathi and Upadhyay, 2009; Natatinon, Chowwanapoonpohn e Okonogi, 2007
<i>H. spicigera</i>	Inseticida	β -cariofileno; α -pineno; sabineno; 1,8-cineol	Ilboudo et al., 2010; Othira et al., 2009; Noudjou et al., 2007;

<i>H. passerina</i>	Antimicrobiano	β -epi-acorenol, espatulenol, β -cariofileno; óxido de cariofileno	Zellner et al., 2009;
<i>H. mutabilis</i>	Antimicrobiano; Antifúngico; epóxido de cis-piperitona	Fenchona, Cineol, trans- β -Cariofileno, Bicyclogermacreno, Germacreno	Bueno-Sánchez et al., 2009; Zapata et al., 2009
<i>H. verticillata</i>	Inseticida	Cadina-4,10(15)-dien-3-ona / aromadendr-1(10)-en-9-ona	Facey et al., 2005
<i>H. ovalifolia</i>	Antifúngica	γ -cadineno; viridifloral; óxido de cariofileno	Oliveira et al., 2004; Souza, 2003

QUADRO 2. Principais atividades e compostos químicos encontrados em extrato aquoso das diferentes espécies de *Hyptis*.

Espécies	Atividades	Metabólitos isolados ou identificados	Referências
<i>H. pectinata</i>	Antidepressivo; Hepatoprotetor; Antiedematogênica;	-	Bueno et al., 2006; Melo et al., 2006; Arrigoni-Blank et al., 2005;
<i>H. fruticosa</i>	Antinociceptivo;	-	Silva et al., 2006;
<i>H. sidifolia</i>	Antibacteriano;	-	Bussmann et al., 2010;
<i>H. suaveolens</i>	Antiulcerogênico;	-	Das et al., 2009;
<i>H. spicigera</i>	Anticonvulsivante	-	Ngo Bum et al., 2009

QUADRO 3: Principais compostos químicos descritos para o gênero *Hyptis*

 Germacreno D	 Trans-cariofileno
 β -cariofileno	 α -pineno
 Beta-pineno	 1,8-cineol
 α -terpinoleno	 óxido de cariofileno

2.3 *Hyptis pectinata*

Hyptis pectinata (L.) Poit (Lamiaceae) é uma espécie odorífera nativa dos estados de Sergipe e Alagoas, conhecida popularmente como “sambacaitá” ou “canudinho” (figura 1). No estado de Sergipe a *H. pectinata* é extensivamente usada pela população local para o tratamento de inflamações (MALAN et al., 1988), infecções bacterianas (ROJAS et al., 1992), dores e até mesmo câncer (MALAN et al., 1988). O uso popular tem despertado interesse da comunidade científica em investigar a composição química e a atividade antimicrobiana dos óleos voláteis das folhas (MALAN et al., 1988; ASEKUN et al., 1999), bem como os efeitos farmacológicos dos seus extratos (BISPO et al., 2001).



Figura 1. Partes aéreas da *Hyptis pectinata*.

Os estudos fitoquímicos da espécie relatam para os extratos fracionados das folhas a presença de α -pironas (figura 2) hyptolídeo e pectinolídeos A, B, C. Estes compostos isolados apresentaram atividade antimicrobiana frente ao *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*, além de alta citotoxicidade contra uma variedade de células cancerígenas (PEREDA-MIRANDA et al., 1993). Posteriormente, Boalino e colaboradores (2003), descreveram a estrutura química de mais duas 5,6-dihidro- α -pironas, os pectinolídeos D e E, além de uma tetrahidropirona e uma furanona, pectinolídeos F e G, respectivamente. A atividade antimicrobiana contra uma variedade de cepas de *Staphylococcus aureus* e ação citotóxica destes novos compostos foram demonstradas por FRAGOSO-SERRANO et al., 2005.

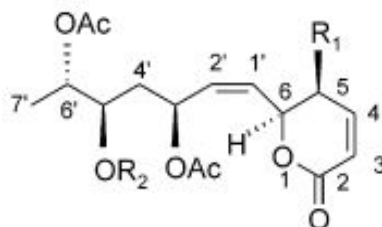


Figura 2. Estrutura da alfa-pirona identificada nas folhas de *H. pectinata* e relacionada com a atividade antibacteriana.

A análise dos constituintes químicos do óleo essencial de *H. pectinata* é alvo de diversos trabalhos que relatam principalmente a presença de compostos terpênicos, com predominância de monoterpenos (MALAN et al., 1988). No que diz respeito à composição do extrato bruto a literatura é bastante escassa. Um estudo preliminar da caracterização fitoquímica do extrato aquoso da espécie realizado no laboratório de Farmacognosia do Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Sergipe (UFS) relatou a presença de alcalóides, taninos e flavonóides. Especialmente na UFS a espécie tornou-se um protótipo para produção de fitoterápicos pelos bons resultados que tem apresentado em estudos realizados.

O extrato aquoso das folhas apresentou baixa toxicidade (BISPO et al., 2001), estimulou a regeneração contra danos hepáticos em ratos parcialmente hepactomizados (MELO et al., 2005; SILVA et al., 2002), apresentou efeito antidepressivo (BUENO, 2005), antiedematogênico e antinociceptivo (BISPO et al., 2001; LISBOA et al., 2006), sendo esta última atividade também atestada para os óleos voláteis (ARRIGONI-BLANCK et al., 2007). Recentemente, num estudo preliminar, o extrato aquoso apresentou atividade antioxidante *in vitro* (frente a radicais DPPH), abrindo novas perspectivas de utilização da espécie no tratamento de patologias onde os radicais livres e/ou estresse oxidativo estejam envolvidos (RAMOS, 2009).

As atividades farmacológicas descritas até o presente momento para *H. pectinata* fazem desta espécie uma matéria-prima promissora para elaboração de medicamentos fitoterápicos. A carência de estudos tecnológicos aliada às perspectivas de potencial terapêutico estimula a presente proposta. Além disso, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, aprovada por meio do Decreto Presidencial Nº. 5.813, de 22 de junho de 2006, veio incentivar a utilização e o desenvolvimento de novos fitoterápicos através da criação do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos-PNPMF que visa ampliar a lista de fitoterápicos oferecidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) de forma a fomentar o desenvolvimento sustentável da cadeia produtiva de medicamentos no Brasil. O desenvolvimento de um extrato padronizado e com comprovada atividade biológica utilizando espécies vegetais cultivadas na região Nordeste é de grande importância para a política de implementação da fitoterapia no SUS e fortalecimento da indústria

regional e nacional de fitoterápicos, disponibilizando à população uma alternativa terapêutica de custo mais acessível.

2.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Segundo Jardins; Collins; Guimarães (2006) a técnica de CLAE possibilita a padronização de extratos vegetais e, se baseia na repartição dos analitos entre duas fases, uma fase móvel e outra estacionária, de forma a permitir a separação e identificação de compostos. Esta técnica também permite a realização de análises em curto espaço de tempo, variando de minutos até uma hora apresentando alta resolução e eficiência, se tornando assim uma boa alternativa para o desenvolvimento de metodologias para o controle de qualidade de extratos vegetais e fitoterápicos.

Jardim *et al.*, (2006) descreve o processo de análise por CLAE de forma que essa técnica promove a separação dos componentes da amostra a qual é introduzida no aparelho pelo sistema de injeção, a amostra entrará na coluna cromatográfica e fará contato com as duas fases, estacionária e móvel, este processo ocorre sob uma pressão controlada e gerada por uma bomba e, ao passo que a amostra vai percorrendo a coluna acontece a separação dos compostos de acordo com a afinidade destes pelas duas fases. Quando os compostos saem da coluna, atingem o detector o qual vai fazer uma correlação entre o sinal gerado na célula de detecção e a concentração dos compostos, este sinal é enviado ao sistema de registro e análises (computador).

Segundo GIL (2005) o equipamento para análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é complexo e formado por 6 componentes principais que podem ser melhores entendidos se observar o quadro 4.

QUADRO 4. Principais componentes do equipamento de CLAE e algumas características. Fonte: (GIL, 2005)

COMPONENTES	CARACTERÍSTICAS
(a) Reservatório de solventes	Onde se encontra o solvente da fase móvel.
(b) Bomba de alta pressão	Sistema mecânico que impulsiona a fase móvel para a coluna cromatográfica, composto por controladores de pressão e vazão.
(c) Injetor	Serve como sistema de entrada da amostra para a coluna que é carregada pela fase móvel.
(d) Coluna cromatográfica	Feita de aço inoxidável, de comprimento (entre 10 e 30 centímetros) de calibre e precisão. É o local onde se encontra empacotadas as partículas de fase estacionária e onde ocorre o processo de separação.
(e) Detector	Dispositivo eletrônico que responde a variação da composição do efluente da coluna, gerando sinais elétricos. Os principais detectores são: UV-VIS, Fluorescência, eletroquímico e massas.
(f) Processador de dados	Sistema que analisa e processa os dados provenientes do detector e os transforma em sinais gráficos chamados de cromatograma.

Os métodos desenvolvidos por CLAE precisam ser validados, para isto existem procedimentos descritos em resoluções e guias sendo que, as resoluções são documentos com poder de lei e os guias sugerem uma linha de trabalho a ser seguida e sendo assim, dependem de interpretações. A resolução da ANVISA – RE N° 899, de 29 de maio de 2003, regulamenta o guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Por tanto, para que um medicamento fitoterápico seja registrado na ANVISA o método de análise deve ser validado obedecendo os parâmetros do guia pois, este por ser baseado numa resolução e por tanto, tem base legal e deve ser seguido (BRASIL, 2003).

2.5. Espécies redox-ativas, estresse oxidativo e defesas antioxidantes

Espécies redox-ativas participam de variados processos fisiológicos como: crescimento celular, morte celular programada e senescência celular. Sendo assim, os radicais livres têm um papel fisiológico na sinalização celular redox. Porém, apesar de serem essenciais nas respostas biológicas, o aumento na produção dessas espécies pode resultar em efeitos destrutivos ao organismo (BASHA & RANI, 2003).

Sabe-se que os radicais livres podem ser átomos, moléculas ou íons que apresentam elétron desemparelhado, reativo e instável, o qual, para alcançar um maior grau de estabilidade, tende a se ligar a outro elétron (SOUZA & FERREIRA, 2007). No caso das Espécies reativas de oxigênio (EROs) e Espécies reativas de nitrogênio (ERNs) incluem todos os radicais e não radicais derivados do oxigênio e/ou nitrogênio, respectivamente. Estas espécies são eletronicamente instáveis e, por isso, altamente reativos, tendo a capacidade de reagir com um grande número de compostos que estejam próximos. Eles podem exercer a função de agentes oxidantes, atuando como receptores de elétrons, ou de agentes redutores, atuando como doadores de elétrons (AGARWAL et al., 2005).

As principais EROs distribuem-se em dois grupos, os radicalares: hidroxila ($\bullet\text{OH}$), superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peroxila (ROO^\bullet) e alcóxila (RO^\bullet); e os não-radicalares: oxigênio (O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ânion hipoclorito (ClO^-). Dentre as ERN incluem-se o óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO^-) (HALLIWELL e GUTTERRIDGE, 1999).

Em condições fisiológicas normais é mantido um controle das reações de formação de espécies redox-ativas através do sistema de defesa antioxidante do organismo por meio de substâncias que atuam de forma variada. Primariamente este sistema de defesa é constituído por substâncias que impedem a geração ou sequestram EROs. Fazem parte deste sistema as enzimas antioxidantes e quelantes, proteínas e substâncias não enzimáticas. Secundariamente este sistema de defesa é

constituído por compostos fenólicos, como flavonoides (flavonas e flavonóis) (HALLIWEL e GUTTERIDGE, 2007).

Algumas substâncias derivadas do metabolismo secundário dos vegetais como os compostos fenólicos e, dentre estes os flavonoides, tem reconhecido potencial antioxidante de tal forma que alguns trabalhos tem abordado aspectos clínicos e nutricionais desta classe de metabolito e, demonstram que estes constituintes reduzem a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e protegem as membranas celulares de espécies redox e, estes achados sugerem a utilização destes metabólitos como estratégia na redução do risco de câncer e doenças cardíacas (MOURE *et al.*, 2001).

A literatura relata uma variedade de compostos fenólicos com potencial antioxidante para *H. pectinata* (BOALINO *et al.*, 2003; FRAGOSO-SERRANO *et al.*, 2005). Porém, os estudos sobre o potencial antioxidante da *H. pectinata* são escassos onde observamos apenas um trabalho que descreve a referida atividade do extrato aquoso frente a radicais DPPH (RAMOS, 2009).

2.6. Produtos Naturais e atividade antimicrobiana

Produtos oriundos de vegetais são fontes importantes de compostos com atividade biológica. As plantas medicinais são uma das melhores fontes para se obter drogas de uso variado (NASCIMENTO *et al.*, 2000; CAETANO *et al.*, 2002).

Há uma crescente busca por novas substâncias com atividade antimicrobiana para serem usadas frente a microrganismos principalmente, devido ao crescente relato do aparecimento de resistência a antimicrobianos em populações de bactérias potencialmente patogênicas (OKEKE *et al.*, 1999). Estes relatos reforçam a busca por plantas medicinais com potencial terapêutico para o tratamento de variadas infecções que acometem seres humanos (VERDI *et al.*, 2005).

Uma variedade de testes biológicos, são utilizados para investigar o potencial antimicrobiano de extratos vegetais, com a finalidade de determinar o agente antimicrobiano mais eficiente. Dentre os testes disponíveis para determinar essa atividade encontram-se as técnicas de disco de difusão, diluição e microdiluição em caldo e, os métodos automatizados (COLE, 1994).

Com relação a espécie *H. pectinata*, existem estudos que observaram a atividade de substâncias isoladas desta, (alfa-pironas e pectinolídeos) contra uma variedade de cepas de *Staphylococcus aureus* (FRAGOSO-SERRANO *et al.*, 2005). Rojas e colaboradores (1992) demonstraram que o decocto, das partes aéreas, apresentou atividade inibitória frente a cepas de *Staphylococcus aureus*.

Neste contexto, pesquisas direcionadas para verificar o potencial antimicrobiano de uma planta usada tradicionalmente pela população do estado de Sergipe são muito importantes, uma vez que estas podem proporcionar grandes chances de se agregar conhecimento às espécies estudadas, influenciando a descoberta de novas possibilidades que venham a contribuir para o desenvolvimento de novos medicamentos fitoterápicos.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL:

O objetivo do presente trabalho é o desenvolvimento de produto seco por aspersão a partir de uma solução extrativa de *H. pectinata* padronizada e investigação de suas atividades antioxidante e antimicrobiana *in vitro*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Preparar e caracterizar, em escala laboratorial, produtos secos por nebulização a partir da solução extrativa de *H. pectinata* (ESHP);
- Desenvolver metodologia analítica em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (CLAE-EM) para padronizar o extrato seco e produtos derivados de *H. pectinata* (ESHP);
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do ESHP;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do ESHP em ensaios *in vitro*;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material Vegetal

Partes aéreas (folhas e talos em condições adequadas, sem a presença de fungos ou outros contaminantes) de *Hyptis pectinata* (L.) foram coletados no Horto de plantas medicinais ([10°18 '20,7 "(S); 36° 39' 7.2" (W) da Universidade Federal de Sergipe (São Cristóvão, Brasil). A identificação da planta e o depósito da exsiccata foi realizado pelo Departamento de Biologia da Universidade Federal de Sergipe (voucher ASE 2626).

4.2. Preparação da solução extrativa de *Hyptis pectinata* (SEHP)

Uma solução extrativa (SEHP) foi preparada por decocção das partes aéreas de *Hyptis pectinata* (L.) durante 15 minutos em uma proporção planta: solvente de 1,5: 10 (m/v), o solvente neste caso foi água destilada. A SEHP foi filtrada e o volume foi completado até 100,0 mL com água destilada.

4.3. Preparação do extrato seco por aspersão em spray-dryer (ESHP)

O ESHP foi obtido a partir da solução extrativa (SEHP) usando como adjuvante de secagem o Aerosil. A SEHP foi seca por atomização utilizando um aparelho Buchi Modelo 191-secador por pulverização (equipamento utilizado na Universidade Federal do Piauí), com bocal de dois componentes e o fluxo de corrente, sob as seguintes condições de operação: temperatura de entrada 157-160 °C; taxa de alimentação 3 mL/min e pressão de pulverização de 2 bar. Todo o ESHP continha 70% de extrato bruto e 30% do adjuvante tecnológico.

4.4. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massas

4.4.1. Preparo das amostras para análise em CLAE-EM

A amostra do ESHP foi diluída a partir de uma solução contendo metanol/água (50:50 v/v) até a concentração de 0,005 µg/mL. Todas as soluções foram filtradas através de um filtro de membrana de 0,45 µm (Millipore-HVHP, MA, EUA).

4.4.2. Condições e especificações das análises por CLAE-EM

A análise por CLAE-EM foi realizada utilizando um aparelho de cromatografia líquida Shimadzu equipado com um degaseificador DGU-20A3, um amostrador automático SIL-20A, duas bombas LC-20AD, detector de arranjo de fotodiodos SPD-M20Avp (DAD) com uma interface CBM-20A. Foi utilizada uma coluna Shim-pack CLC-ODS (M) RP-18 (5 μ m - 250 milímetros x 4 mm de diâmetro interno), acoplada a uma pré-coluna Lichrosorb RP-18 (Waters Millenium, Milford, MA, EUA). Os espectros de ultravioleta (UV) dos picos não identificados, obtidos por detecção PDA, foram adicionalmente analisados por comparação à literatura. O método analítico empregou um sistema de gradiente linear que consistiu de (A) ácido acético: água 1,0% (v / v); (B) metanol. O gradiente de eluição para os primeiros 5 minutos foi de 10% B, 15 - 20% de B durante 10 minutos, 20% de B, entre 15 - 25 minutos, a 40 - 60% de B, entre 30 - 40 minutos, e o sistema volta para as condições iniciais em um tempo de funcionamento de 60 minutos. A taxa de fluxo foi ajustada para 0,6 mL/min, comprimento de onda de detecção a 340 nm, sendo o volume de injeção igual a 20 μ L. A sensibilidade foi de 0,05 AUFS. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

A análise por espectrometria de massas foi realizada em espectrômetro de massas Brucker equipado com fonte de ionização de armadilha de íons. O modo de íons negativos [m/z MH] foi usado para todos os compostos. A ionização por Captura de íons foi operada nas seguintes condições de operação: pressão do nebulizador: 40 psi; Fluxo de gás seco: 9 L/min; temperatura do gás de secagem: 300 °C; taxa de fluxo: 200 mL /min.

Os compostos foram identificados comparando o seu tempo de retenção com os espectros de ultravioleta correspondente ao obtido com as substâncias de referência. Adicionalmente, foram, também, identificados por meio de seus espectros de massa (MS/MS). As curvas de calibração da substância de referência (rutina) foram utilizadas para fins de quantificação.

4.5. Desenvolvimento e validação de Metodologia analítica para quantificação do ESHP

O método foi validado de acordo com a Resolução de Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos previsto na RDC 899 (ANVISA, 2003). Os parâmetros

utilizados na validação do método foram: linearidade, limite de quantificação e detecção, precisão e exatidão. Os parâmetros de validação para o ESHP, foi estipulado usando as curvas de calibração obtidas para a substância de referência (padrão), a rotina.

4.5.1. Linearidade e Curva padrão

A linearidade foi obtida através da curva de calibração do padrão rotina. Esta curva foi determinada a partir de cinco concentrações diferentes: 2, 4, 6, 8, 10 mg/mL. A equação de regressão foi calculada através da construção da curva de calibração.

4.5.2. Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

O LD e LQ foram calculados com base no desvio padrão e o declive da curva de calibração.

4.5.3. Precisão

A precisão do método foi investigada em relação a repetibilidade (precisão intra-dia) e precisão intermediária (precisão inter-dia) pela determinação da solução padrão (rotina), a 100% da concentração de ensaio. Para avaliar a reprodutibilidade do método, a amostra foi injetada dentro de seis vezes por dia. A precisão intermediária foi determinada com a amostra testada em dias diferentes e por outro analista.

4.5.4 Exatidão

A precisão do método foi determinada por injeção de três amostras nas concentrações de 2, 6 e 10 mg/mL, teste realizado em triplicata e em três níveis diferentes LQC (baixo), MQC (médio) e HQC (alto), respectivamente. A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente de acordo com a equação 1.

4.5.5. Robustez

A robustez do método foi determinada através de uma alteração deliberada nas condições experimentais a fim de permanecer inalterada. Foi avaliada por pequenas variações na taxa de fluxo e na composição da fase móvel.

$$Exatidão = \frac{Concentração\ média\ experimental}{Concentração\ teórica} \times 100$$

Equação 1

4.6. Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

4.6.1. Potencial Antioxidante Total (TRAP) e Reatividade Antioxidante Total (TAR)

Esta etapa foi realizada na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Bioquímica, Laboratório 32 (Centro de Estudos em Estresse Oxidativo).

Este método determina a capacidade antioxidante não enzimática, obtida através da medida da intensidade de quimioluminescência do luminol induzida pela adição de 2, 2'-azo-bis (2-amidinopropano) (ABAP) à temperatura ambiente. O método se baseia no tempo de indução da oxidação de uma dispersão lipídica exposta ao ABAP, que representa fonte de radicais livres com taxa de produção constante e conhecida (LÓPEZ-ALARCÓN C.; DENICOLA, A., 2013)

Primeiramente, a solução de AAPH (concentração final de 120 mM) foi preparada por adição do reagente de AAPH em 100 mM de tampão de glicina em pH 8,6 (20 mL de volume final), seguido pela adição do luminol (4 µl, 0,001 mM de concentração final) no escuro e, depois, permitiu-se que o sistema estabilizasse por 2 horas antes da primeira leitura (BITTENCOURT e *al.*, 2014). Diferentes concentrações de ESHP foram adicionadas e, a luminescência produzida pela reação do radical livre foi quantificada num contador de cintilação líquido (Wallac 1409, Perkin-Elmer, Boston, MA, EUA) durante 2 h. O sistema foi considerado a quimioluminescência emitida pela termólise do AAPH sozinho. Os dados foram transformados em área sob a curva

(AUC) calculada pelo software (Graph Pad software® San Diego, CA, EUA; versão 5.0) (DRESCH *et al.*, 2009).

A Reatividade Antioxidante Total (TAR) foi obtida através de leituras no mesmo experimento. Estes resultados foram calculados como a razão entre a intensidade da luz, na ausência de amostras (I_0)/intensidade de luz após a adição da amostra (ESHP) (LISSI *et al.*, 1995).

4.6.2. Teste de atividade *scavenger* de radicais hidroxila do ESHP (\bullet OH)

O ensaio baseia-se no método de hidroxilação de 2-deoxiribose descrito por CHUNG e colaboradores (1997). Em tubos Pirex com tampa de rosca são adicionados 0,2 mL de benzoato de sódio (10 mM) e 0,5 mL de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10 mM) em solução de EDTA (10 mM). A este meio foi adicionado o ESHP em diferentes concentrações definidas experimentalmente em ensaios piloto. Após a adição das amostras foi adicionada a solução de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) até volume de 1,8 mL. Ao final, foi adicionado 0,2 mL de H_2O_2 10 mM. Esta mistura foi incubada a 37°C por 2h.

Após a incubação 1mL de ácido tricloroacético (TCA) (2,8 %) e ácido tiobarbitúrico (TBA) (1,0 %), respectivamente forão adicionados. A mistura final foi aquecida em banho-maria durante dez minutos. Após este período a absorvância foi medida a 532 nm. O percentual de inibição de radicais hidroxila (atividade *scavenger* de radicais hidroxila) foi expresso pela equação 2.

$$\% \text{Inibição} = \frac{\text{Abs}_{\text{CONT}} - \text{Abs}_{\text{AMOS}}}{\text{Abs}_{\text{CONT}}} \times 100$$

Equação 2

4.6.3. Avaliação do potencial antioxidante do ESHP na inibição de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico *in vitro* (TBARS)

Este teste é utilizado para quantificar a peroxidação lipídica (ESTERBAUER & CHEESEMAN, 1990). O método foi utilizado para medir a capacidade antioxidante do ESHP usando gema de ovo homogeneizado como substrato rico em lipídios

(GUIMARÃES et al., 2010). Neste teste a gema de ovo foi homogeneizada (1% w/v) em tampão fosfato 20 mM (pH 7,4), em seguida 1 mL de homogenato sonicada e, ao homogeneizado obtido adicionado 0,1 mL de ESHP em diferentes concentrações (0,1; 1; 10 e 100 µg/L). A peroxidação lipídica foi induzida pela adição de 0,1 mL da solução de AAPH 0,12 M. Ao grupo controle foi adicionado apenas o veículo (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%). As reações foram realizadas durante 30 min a 37 °C. Após o resfriamento, as amostras (0,5 mL) foram centrifugadas com 0,5 mL de ácido tricloroacético (15%) a 1200 rpm por 10 min. Uma alíquota de 0,5 mL de sobrenadante foi misturada com 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico 0,67% (TBA) e aquecida a 95 °C durante 30 min.

Após o resfriamento, a absorbância das amostras foi medida por meio de um espectrofotômetro a 532 nm (SpectraMAX 190 da Molecular Device). Os resultados foram expressos em porcentagem de TBARS formadas apenas por AAPH sozinho (controle induzido).

4.6.4. Avaliação do potencial antioxidante do ESHP na remoção de óxido nítrico *in vitro* (NO)

O óxido nítrico é gerado a partir da decomposição espontânea do nitroprussiato de sódio (NPS) em tampão fosfato 20 mM (pH 7,4). Uma vez gerado, o NO interage com o oxigênio para produzir íons nitrito, que serão medidos pela reação de Griess (BASU & HAZRA, 2006). A mistura de reação (1 mL) contendo NPS em tampão fosfato 10 mM e ESHP em diferentes concentrações (0,1; 1; 10 e 100 µg/L) foram incubadas a 37 °C durante 1 h. Uma alíquota de 0,5 mL foi retirada e misturada com 0,5 mL de reagente de Griess. A absorbância do cromóforo foi medida em 540 nm. A porcentagem de inibição do óxido nítrico gerado é medida por meio da comparação dos valores de absorbância dos controles negativos (nitroprussiato de sódio 10 mM e do veículo). Os resultados serão expressos em porcentagem de nitrito formado por NPS sozinho.

4.7. Avaliação da atividade antimicrobiana

4.7.1. Micro-organismos

Os testes microbiológicos foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Clínica (LPMC) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, utilizando os seguintes microrganismos cepas-padrão ATCC (“American Type Culture Collection”): *Staphylococcus aureus* (ATCC 6835), *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442). Todas as bactérias foram armazenadas sob congelamento em freezer à temperatura de -20°C e 24 horas antes da realização do experimento, foram repicados em Ágar de Soja Trypticaseína (TSA) e incubados a 35°C.

4.7.2. Método de Difusão em Disco

O ensaio de atividade antimicrobiana foi realizado através do método de difusão em disco (BAUER et al., 1966), com base no documento M2-A8 (NCCLS, 2003a), onde cada disco estéril de papel filtro (Qualit, ref. N°045.PF) de 6,0 mm de diâmetro foi impregnado com alíquotas (10 µL) do ESHP na concentração de 1 mg/disco (SANTOS et al., 2007a). Entre as aplicações das alíquotas de 10 µL, os discos foram secos em estufa a 35° C por 5 minutos (BAUER, 1966; NAVARRO & DELGADO, 1999; NAGNE et al., 2000).

As suspensões microbianas foram preparadas, colocando-se cinco unidades formadoras de colônias (UFC) em 5 mL de solução salina esterilizada (0,9% de NaCl) comparadas e ajustadas à escala padrão 0,5 de McFarland. Em seguida, com auxílio de um *swab* esterilizado, foram semeadas em superfície de uma placa de Petri contendo ágar Mueller-Hinton. Após as sementeiras, os discos foram então aplicados com auxílio de uma pinça e as placas foram incubadas em condições de aerobiose a 37 °C, por 24 h.

Após o período de incubação, as zonas de inibição de crescimento microbiano foram medidas e registradas em milímetros de diâmetro. Como controles positivos foram utilizados discos com 100 µg de cloranfenicol e gentamicina.

4.7.3. Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os ensaios de sensibilidade de micro diluição em caldo foram feitos, de acordo com as recomendações da National Committee for Clinical Laboratory Standards

(2003b). Os testes foram realizados em caldo Mueller Hinton (CMH) (Himedia) contido em microplacas de 96 poços. O ESHP foi aplicado nos poços, seguindo a técnica de diluição seriada, nas concentrações de 0,019; 0,039; 0,078; 0,156; 0,312; 0,625; 1,25; 2,5 mg/mL. A partir de uma suspensão ajustada da escala padrão 0,5 de McFarland das cepas bacterianas testadas, foram feitas diluições com água destilada autoclavada de 1:10 (v/v) para obter uma concentração final de bactérias de 5×10^4 UFC/poço. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. A leitura foi realizada através da mudança de cor do revelador, cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) (Nuclear), considerando o resultado positivo a ausência de coloração e negativo na presença de coloração rosa-avermelhada.

4.8. Análise Estatística

As análises estatísticas dos dados obtidos foram realizadas através de análise de variância (ANOVA), complementada por teste post hoc de Tukey de comparações múltiplas. Em todos os casos as diferenças foram consideradas significativas se $p < 0,05$. Os dados foram analisados utilizando o software Graph Pad® San Diego, CA, EUA; versão 5.0.

5. Discussão e Resultados

5.1. Análise da SEHP e do ESHP por CLAE

Devido à complexidade da matriz e ao longo tempo de análise requerido, optou-se pelo emprego de um sistema de eluição em gradiente linear. A fase móvel constituída de uma mistura de ácido acético: água 1,0% (v / v) e metanol apresentou adequada resolução e separação dos picos, permitindo, assim, a quantificação das substâncias de referência na matéria-prima vegetal. O tempo de análise também foi adequado visto que todos os compostos foram identificados em um tempo inferior a 40 min. Após a varredura da SEHP, selecionou-se o comprimento de onda de 340 nm. O sistema cromatográfico permitiu que todos os picos estivessem claramente separados e bem resolvidos. Os picos foram identificados pelo tempo de retenção, e os seus espectros de ultravioleta comparados com as substâncias de referência (padrões). Os picos também foram identificados por espectrometria de massa (EM).

O perfil cromatográfico do SEHP por CLAE revela a presença de três picos bem separados e com boa resolução. O tempo de retenção (TR) dos picos 1 (P1), 2 (P2) e pico 3 (P3) foram, respectivamente, 7, 20, 23 minutos. P1, P2 e P3 foram identificados como o ácido caféico, quercetina e rutina, respectivamente. A identificação foi feita por análise de padrões que apresentaram o mesmo tempo de retenção do respectivo pico (Figura 3). Os espectros de massa dos compostos identificados são apresentados na Tabela 1.

5.2. Teor de polifenóis no ESHP

Os perfis cromatográficos da SEHP e ESHP não apresentaram diferenças significativas. Não foi observada qualquer alteração no tempo de retenção dos picos principais ou o aparecimento de produtos de degradação, como mostrado na Figura 3.

Foi realizada a quantificação e identificação de polifenóis para o ESHP e os compostos foram quantificados usando curvas obtidas da rutina. O conteúdo total de polifenóis presentes são apresentados na Tabela 1.

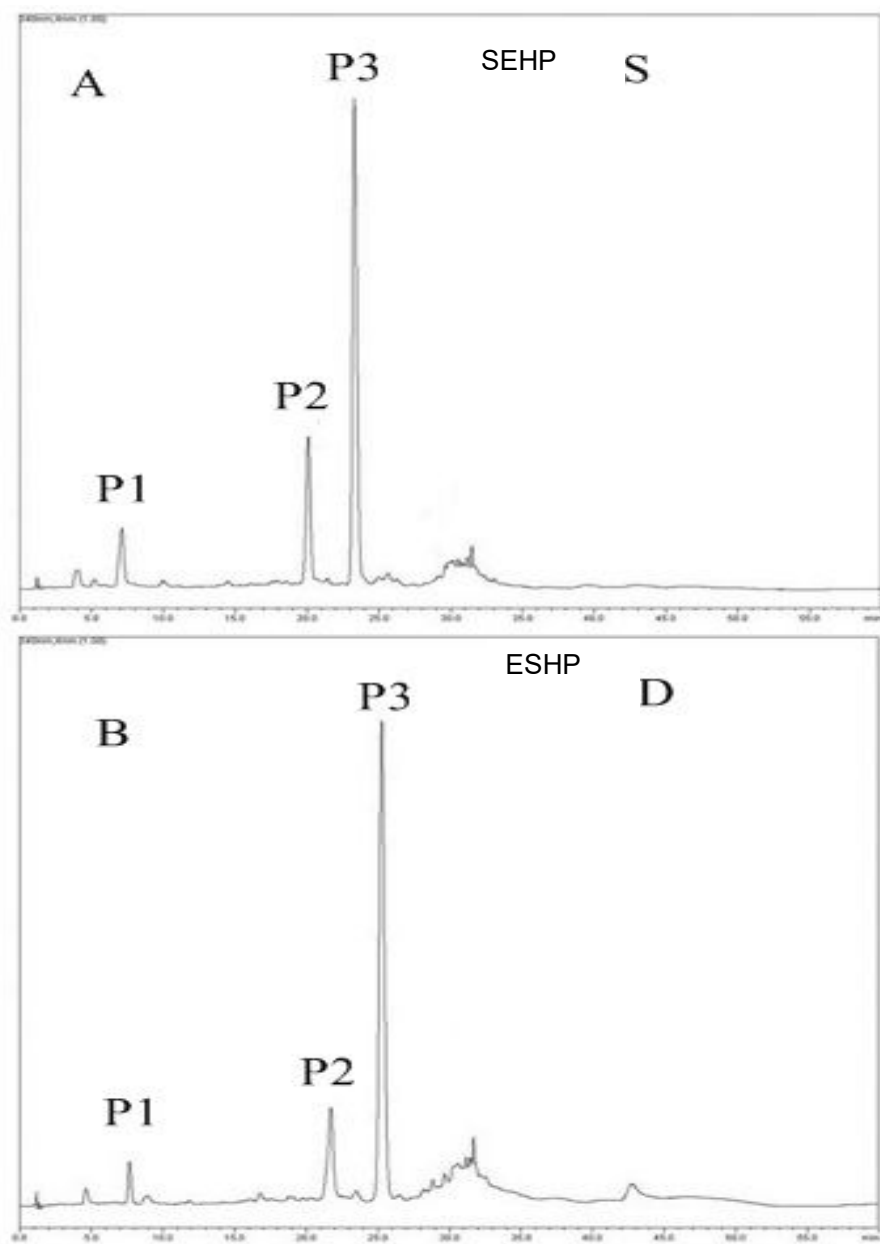


Figura 3. A: perfil cromatográfico do SEHP. B: perfil cromatográfico do ESHP.

Tabela 1: Tempos de retenção, compostos identificados, teor dos compostos em percentagem em gramas (g%) no extrato seco (ESHP) e, seus respectivos espectros de massa.

Picos	TR (min.)	Compostos	MS $[M - H]^-$ m/z	MS ² $[M - H]^-$ m/z	Teor (g%)
P1	7	Ácido caféico	178,93	134,96	0,02
P2	20	Quercetina	463,00	300,90	0,07
P3	25	Rutina	609,12	300,97	0,34

A qualidade do material vegetal destinado ao desenvolvimento de um medicamento fitoterápico depende de aspectos botânicos, químicos, farmacológicos e de pureza. Desta forma é necessário identificar os compostos presentes no material vegetal e determinar os seus teores (BRASIL, 2014). Além disso é necessário validar e garantir, por meio de estudos experimentais, que o método desenvolvido atenda as exigências das aplicações analíticas assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003).

Com relação aos compostos aqui identificados (ácido caféico, quercetina e rutina, figura 4) estes, são conhecidos principalmente por suas propriedades antioxidantes. O Ácido caféico possui propriedades antioxidantes como inibição da peroxidação induzida de microssomas, inibição da peroxidação de células de eritrócitos e monócitos e, inibição da oxidação de LDL (PULLA REDDY & LOKESH, 1992; NARDINI *et al.*, 1998; VIEIRA *et al.*, 1998).

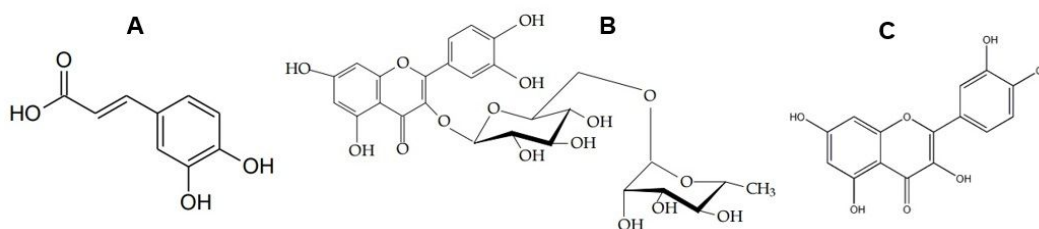


Figura 4. Estrutura dos compostos identificados no ESHP. **A** = Ácido caféico, **B** = Rutina, **C** = Quercetina.

A rutina é um flavonóide pertencente a subclasse dos flavonóis e suas atividades tem interessado muito a indústria farmacêutica. É encontrada em vários alimentos como cebola, maçãs, tomates e bebidas como o vinho tinto e o chá a base de *Camellia sinensis* como chá preto, chá verde e chá branco. (THOMPSON *et al.*, 1999; HOLLMAN *et al.*, 1995; HOLLMAN *et al.*, 1996).

A rutina quando hidrolisada perde o grupo glicosídico e dá origem a quercetina. Afanas`ev e colaboradores (1999) pesquisaram a atividade antioxidante da rutina e da quercetina e constataram que estes flavonóides têm uma ação terapêutica em patologias que envolvem a presença de radicais livres como atividade anti-inflamatória na artrite (GUARDIA *et al.*, 2001) possuindo baixa toxicidade.

5.3. Validação da metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência

A linearidade foi avaliada por análise das curvas de calibração para a substância de referência rutina obtidas em três dias diferentes. A curva de calibração obtida da rutina foi linear em relação às concentrações de 2, 4, 6, 8 e 10 µg/ml. A curva de calibração foi linear no intervalo de concentração de 2,0-10,0 µg/ml com coeficiente de regressão de (r^2) 0,9992. O limite de confiança, calculado para interceptar, incluindo zero, demonstra a ausência de erros sistemáticos constantes. Os limites de detecção e quantificação estabelecidos foram, respectivamente, 0,067 µg/ml e 0,226 µg/ml. Estes valores demonstram a sensibilidade adequada do método.

A repetibilidade e precisão intermédia foram obtidas por análise da concentração de 6 µg/mL da substância de referência rutina. Os resultados da precisão são mostrados na Tabela 2. Os resultados mostraram um coeficiente de variação (tabela 3) menor do que o recomendado pela RDC 899 (Anvisa, 2003), cujo limite é de 5%. Além disso, não houve diferenças significativas entre os resultados do ensaio, indicando que a precisão do método proposto foi satisfatória.

Para a exatidão realizou-se a análise de três concentrações (2, 6, 10 µg/ml) de rutina em triplicata (Tabela 3). Os resultados mostraram um coeficiente de variação menor do que o recomendado pela RDC 899 (ANVISA, 2003), cujo limite é de 5%.

Tabela 2: Resultados de repetibilidade e precisão intermediária da substância de referência rutina analisada por CLAE.

	Média ($\mu\text{g/mL}$) \pm DP (n=3)	DPR %
Repetibilidade	6.06 \pm 0.04	0,66
	Média ($\mu\text{g/mL}$) \pm DP (n=3)	DP %
	6,24 \pm 0.07	1,18
Precisão intermediária	6,14 \pm 0.08	1,35
	6,30 \pm 0.14	2,30

DP: Desvio padrão; DPR: Desvio padrão relativo

Tabela 3: Resultados dos testes de exatidão

Concentração Teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração experimental ($\mu\text{g/mL}$)	Exatidão %	Acurácia	
			Média \pm DP (n=3)	C.V. %
2	2,02	101,0	101,3 \pm 1,04	1,02
	2,05	102,5		
	2,01	100,5		
6	5,98	99,66	100,1 \pm 0,47	0,46
	6,04	100,6		
	6,01	100,1		
10	10,13	101,3	100,8 \pm 0,50	0,49
	10,08	100,8		
	10,03	100,3		

5.4. Resultados dos testes de atividade antioxidante para o ESHP

5.4.1. Potencial Antioxidante Total (TRAP) e Reatividade Antioxidante Total (TAR)

A capacidade antioxidante geral do ESHP foi avaliada pelos métodos TRAP e TAR. No método TRAP, concentrações que variaram de 0,001 a 100 $\mu\text{g/mL}$ mostraram um efeito antioxidante significativo dependente da dose (Figura 5A). Nas concentrações de 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$, o ESHP revelou os melhores resultados, semelhantes aos do Trolox (75 $\mu\text{g/mL}$), que é utilizado como um antioxidante de referência. Concentração do ESHP que variaram de 0,1 a 100 $\mu\text{g/mL}$ mostraram também uma capacidade antioxidante significativa no ensaio TAR (Figura 5B) e, na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ demonstrou resultados melhores do que o grupo do padrão Trolox.

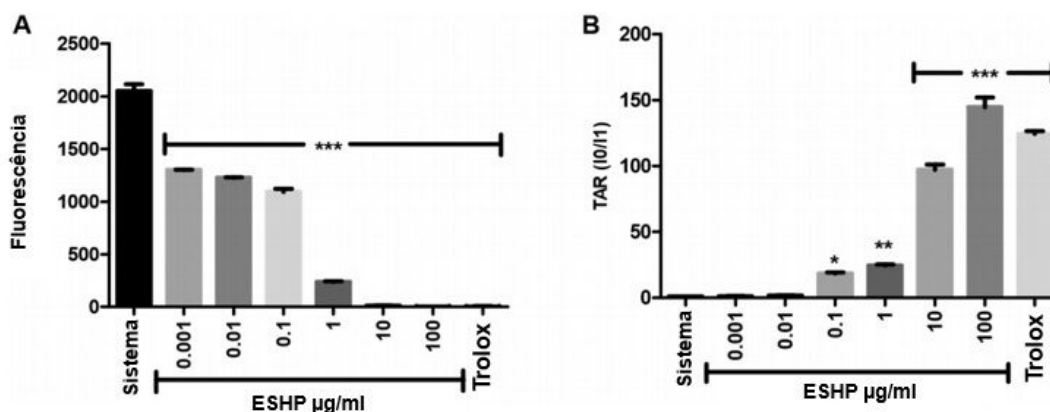


Figura 5. (A) potencial antioxidante total (TRAP); (B) Reatividade Antioxidante Total (TAR). Trolox (75 µg/ml) foi utilizado como antioxidante padrão. Os valores representam a média ± DP. *** p < 0,001.

Com os ensaios TRAP e TAR foi possível determinar a capacidade antioxidante geral do ESHP. Estes métodos são diferenciados pois, podem estimar a capacidade antioxidante geral *in vitro* das amostras. Na figura 5A, os valores representam a área sob a curva de uma determinação cinética da luminescência induzida por AAPH durante 2 horas (TRAP). Já no método TAR é possível observar o efeito após a adição de um composto antioxidante sob a luminescência que é induzida por radicais livres (SILVA *et al.*, 2007).

Em todas as concentrações testadas o ESHP foi capaz de manter a produção de radicais livres induzida por AAPH inibida durante duas horas (TRAP). Também foi possível observar uma alta eficiência do ESHP na inibição da produção de radicais livres induzidos por AAPH quando adicionado ao sistema em concentrações que variaram de 0,1 a 100 µg/mL (figura 5B). Como podemos ver na Figura 5A, as concentrações de 0,001 e 0,01 µg/mL apresentaram comportamento cinético adequado, mas baixo potencial antioxidante quando foram analisadas pelo método TAR (Figura 5B), justificando, assim, por que essas concentrações foram escolhidas para as restantes análises descritas neste estudo.

Esta análise é importante porque os radicais peroxil formados na reação TRAP participam nas etapas de iniciação e propagação da peroxidação lipídica e pode produzir produtos citotóxicos e genotóxicos. Estes produtos tóxicos podem promover danos celulares envolvidos na patogênese de muitas patologias (WU *et al.*, 2006).

5.4.2. Ensaio da atividade scavenger de radicais hidroxil *in vitro* (\bullet OH)

Em relação à formação do radical hidroxil, todas as concentrações testadas (0,1; 1; 10 e 100 μ g/mL) do ESHP, demonstraram um efeito significativo em relação ao meio responsável pela produção deste radical livre, com porcentagens de produção de hidroxil com relação ao induzido de 87,44; 69,99; 41,04 e 16,84%, respectivamente ($p < 0,001$; Figura 6). O Trolox 200 nM permitiu uma produção percentual de radical hidroxil de 69,18% ($p < 0,05$).

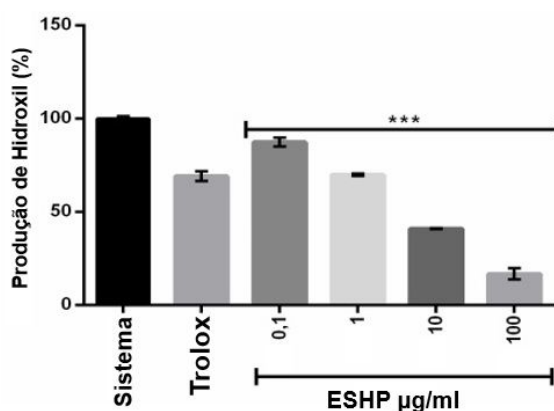


Figura 6. Atividade scavenger de radical hidroxila de ESHP. Os valores representam média \pm DP, experimentos em triplicata. *** $p < 0,001$ diferente do sistema (ANOVA seguido pelo teste de Tukey)

Ainda foi possível calcular a IC 50 para produção de radical hidroxil que gerou uma concentração de 3,402 μ g/mL, r^2 de 0,99 indicando uma correlação de 99% para dose-dependência, figura 7.

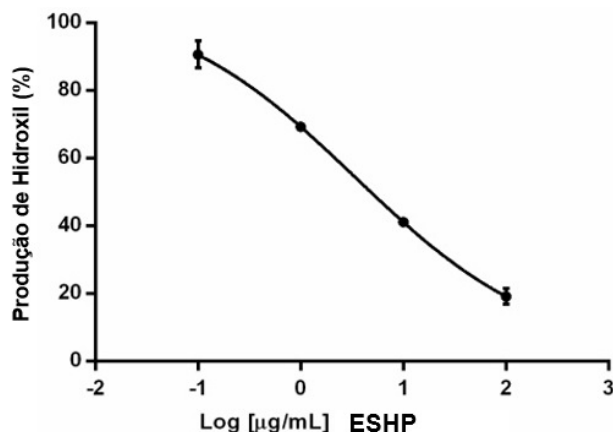


Figura 7. IC50 para produção de radicais Hidroxil

O radical hidroxil é uma espécie reativa encontrada em meios biológicos e sendo responsável por grande parte dos danos celulares causando até quebras na estrutura do DNA, lipoperoxidação de membranas e também, oxidação protéica (HALLIELL E GUTTERIDGE, 2007). Esta ERO está envolvida em algumas enfermidades como a doença de Alzheimer onde a deposição de proteína beta-amiloide aumenta a geração de peróxido de hidrogênio e, conseqüentemente, a geração de mais radicais (HALLIWELL, 2007). Com base nos resultados aqui observados é possível dizer que o ESHP poderia representar uma alternativa promissora para prevenir ou diminuir os danos oxidativos causados pelos efeitos nocivos dos radicais hidroxil.

5.4.3. Avaliação do potencial antioxidante do ESHP na remoção de óxido nítrico *in vitro*

Em relação à produção de nitrito, foram registradas em todas as concentrações testadas de 0,1; 1; 10 e 100 µg/L do ESHP, demonstraram um efeito significativo em relação ao NPS (meio de produção deste radical livre), com produção de 85,82; 78,16; 63,42 e 52,24% respectivamente ($p < 0,05$; Figura 8). Já o Trolox 200 nM (controle positivo) reduziu em 36,47% a produção de nitrito em relação ao NPS.

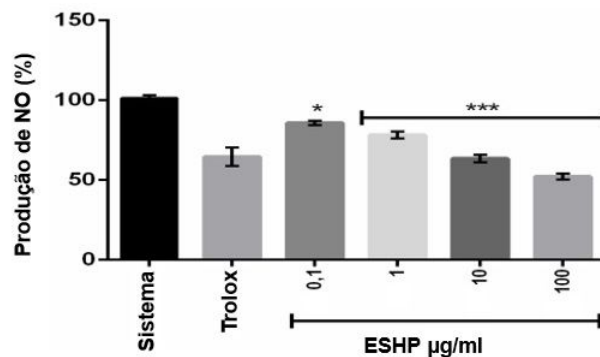


Figura 8. Atividade scavenger de radical de óxido nítrico de ESHP. Os valores representam média \pm SED, experimentos em triplicata. *** $p < 0,001$ diferente do controle (ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

O óxido nítrico é um importante mediador da inflamação aguda e crônica por estimulação da enzima ciclo-oxigenase (COX), que resulta na produção desequilibrada de prostaglandinas pró-inflamatórias. A capacidade do ESHP em capturar o óxido nítrico foi medida por quantificação da produção de nitrito derivado do nitroprussiato de sódio (NPS) pela reação de Griess. Os dados mostram que o ESHP inibiu a formação de NO em até 47,76% na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, indicando um potencial uso na remoção dessa espécie reativa. Este achado é muito importante pois, nas doenças neurodegenerativas o estado inflamatório é uma característica fundamental que contribui significativamente para o aumento do estresse oxidativo e, portanto, a progressão da doença. Uma condição pró-inflamatória pode levar a uma sobrecarga de óxido nítrico e por fim, aumento do dano oxidativo devido à formação de peroxinitrito (HUYNH *et al.*, 2014; MONTEZANO *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2013).

5.4.4. Avaliação do potencial antioxidante da *H. pectinata* na remoção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico in vitro (TBARS)

As concentrações de 0,1; 1; 10 e 100 $\mu\text{g/L}$ do ESHP obtiveram porcentagens de produção de MDA com relação ao induzido de 97,16; 64,54; 21,03 e 17,64% respectivamente. Já o trolox® 200 nM, controle antioxidante, causou uma produção percentual de MDA de 73,93%, como pode-se observar na figura 9. Observou-se que as três maiores concentrações de ESHP apresentaram uma maior diminuição na produção de TBARS quando comparadas as do controle.

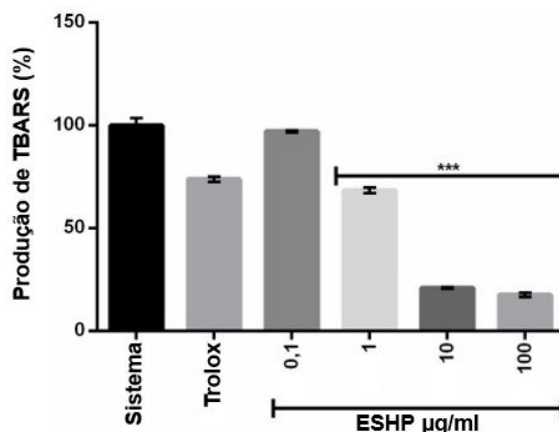


Figura 9. Percentagem de peroxidação lipídica. Os valores representam média \pm SED, experimentos em triplicata. *** $p < 0,001$ diferente do sistema (ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

A peroxidação lipídica pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos que resultam da ação de radicais livres sobre os lipídios insaturados das membranas celulares e, isto pode levar a alterações de permeabilidade, perda de seletividade para a entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas para a célula. Adicionalmente pode levar a alterações de DNA, oxidação de LDL e comprometimento de componentes da matriz extracelular (DAVIES *et al.*, 2014). Para o ensaio frente a TBARS, na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ o ESHP conseguiu inibir até 78,97% destas espécies reativas. Podemos, então, afirmar que o ESHP é um potencial antioxidante pois a literatura de plantas medicinais relata que produtos naturais que apresentam uma redução na peroxidação lipídica de 10 $\mu\text{g/mL}$ são considerados como tendo um elevado potencial antioxidante (ANDRADE *et al.*, 2007).

5.5. Resultado dos testes de atividade antimicrobiana do ESHP *in vitro*

Os resultados obtidos mostram que o ESHP inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6835) mas não foi capaz de inibir o crescimento de *Escherichia coli* (ATCC 10536) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) nas mesmas concentrações (1 mg/disco) (figura 10 e tabela 4). Os testes foram realizados em triplicata e em dias diferentes e, os halos de inibição, para *Staphylococcus aureus* (ATCC 6835), ficaram na faixa de 11 a 13 mm. Os testes foram realizados comparando-se com discos padrões de gentamicina e cloranfenicol.

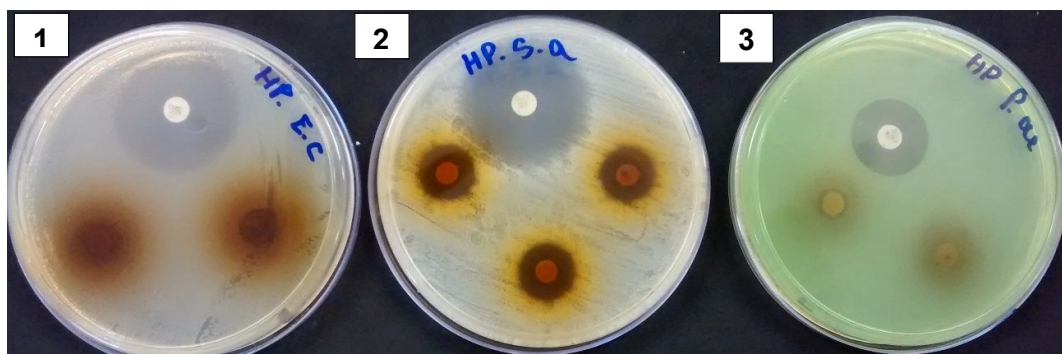


Figura 10. Teste de disco de difusão. (1) ESHP frente a *Escherichia coli* (ATCC 10536); (2) ESHP frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 6835); (3) ESHP frente a *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442). Os discos brancos são padrões antimicrobianos, cloranfenicol na placa 1 e 2 e, gentamicina na placa 3.

Estes resultados corroboram os achados de Rojas e colaboradores (1992) para extrato aquoso de *H. pectinata*, de tal forma que o ESHP se demonstrou efetivo em inibir o crescimento de uma bactéria Gram positiva, neste caso uma cepa padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6835).

Tabela 4. Resultado dos testes antimicrobianos. Halo de inibição dos discos de difusão em milímetros e CIM em mg/ml. R = Resistente.

Microrganismos	Tamanho do halo (média em mm)	CIM (mg/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6835)	12	0,312
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 10536)	R	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 15442)	R	-

O teste de microdiluição em placa de 96 poços, para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do ESHP frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 6835), pois

no teste de disco de difusão só deu positivo para esta bactéria, se mostrou bem reprodutivo e eficaz de forma que obteve uma CIM de 0,312 mg/mL como pode ser melhor observado na figura 11.

Várias vantagens são atribuídas a CIM e, uma delas é que esse método pode ser 30 vezes mais sensível que outros métodos utilizados na literatura. A CIM é considerada, frequentemente, como a melhor metodologia para a avaliação de suscetibilidade ou de resistência das bactérias aos antimicrobianos (OSTROSKY et al., 2008; ALVES et al., 2008)

Segundo Trabulsi e Alterthum (2008) o *S. aureus* é uma bactéria encontrada como membro da microbiota normal do corpo humano, sendo uma das bactérias patogênicas mais importantes de forma que, atua como agente patogênico de uma quantidade considerável de infecções, variando desde aquelas localizadas até algumas disseminadas com elevada gravidade.

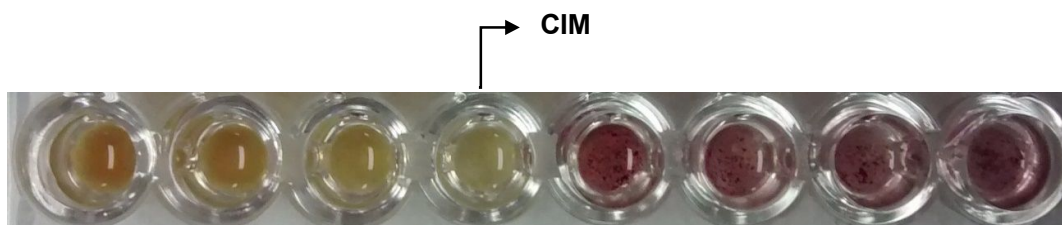


Figura 11: Teste de micro diluição em caldo para ESHP. CIM = concentração inibitória mínima (0,312 mg/mL para ESHP). Os poços com coloração avermelhada é onde há crescimento bacteriano.

Nas condições do experimento, os resultados permitem concluir que ESHP apresenta potencialidades quanto a atividade antibacteriana frente ao *Staphylococcus aureus* (ATCC 6835) *in vitro*, porem são necessários demais estudos que comprovem o uso clínico do ESHP e que garanta sua eficácia e segurança apesar de que a *H. pectinata* é largamente utilizada pelas comunidades tradicionais em processos inflamatórios (MALAN et al., 1988).

6. CONCLUSÕES

- A metodologia analítica empregada na quantificação de polifenóis mostrou-se eficiente para a detecção e quantificação destes constituintes em preparações obtidas a partir de *Hyptis pectinata*;
- A secagem da solução extrativa aquosa de *Hyptis pectinata*, em escala semi-industrial, permitiu a obtenção do produto seco, com características tecnológicas diferenciadas;
- O produto seco apresentou capacidade antioxidante *in vitro*, de maneira dose-dependente, sugerindo que os polifenóis sejam os responsáveis pela atividade antioxidante demonstrada;
- O produto seco demonstrou eficiente atividade antimicrobiana *in vitro* frente a uma bactéria envolvida em várias patologias e sugerindo assim demais estudos para atestar o uso deste produto.

Os resultados até aqui obtidos embasam o uso do produto desenvolvido (ESHP), ainda assim, é necessário realizar ensaios pré-clínicos e clínicos, afim de conferir segurança e eficácia no uso do ESHP e, por fim, propor doses baseadas nas atividades aqui em estudo e com dados de toxicidade já descritos afim de desenvolver formas farmacêuticas que possam ser usadas de forma segura e eficaz pela população.

7. Referências

- AFANAS'EV, J. B.; DOROZHKO, A. J.; BRODSKILL, A. V.; KOSTYUK, V. A.; PATAPOVITCH, A. I., Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. **Biochemical Pharmacology**, Amsterdam, v. 38, p. 1763-1769, 1989.
- AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R.K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reprod Biol Endocrinol.**, 3:1-21. DOI: 10.1186/1477-7827-3-28, 2005.
- ALVES, E.G. *et al.* Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Quím. Nova**, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.
- ANDRADE, C.A.; COSTA, C.K.; BORA, K.; MIGUEL, M.D.; MIGUELI, O.G.; Kerber, V.A. Determination of the phenolic content and evaluation of the antioxidant activity of *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex. G. Don., Leguminosae-mimosoideae. **Rev. Bras. Farmacogn.**, 17, 231–235, 2007.
- APG (Angiosperm Phylogeny Group) III. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, n. 161, p.105-121, 2009.
- ARRIGONI-BLANKA, M.F., ANTONIOLLI, A.R.; CAETANOC, L.C.; CAMPOS, D.A.; BLANK, A.F.; ALVES, P.B. Antinociceptive activity of the volatile oils of *Hyptis pectinata* L. Poit. (Lamiaceae) genotypes. **Phytomedicine**, 2007.
- ASEKUN, O.T., EKUNDAYO, O., ADENIVI, B.A. Antimicrobial activity of the essential oil of *Hyptis suaveolens* leaves. **Fitoterapia**, v.70, p. 440–442, 1999.
- BASHA, P.S.; RANI, A.U. Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in fresh water teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). **Ecotoxicol Environ Saf.**, 56(2):218-21, 2003.
- BISPO, M.D.; MOURÃO, R.H.V.; FRANZOTTI, E.M.; BOMFIM, K.B.R.; ARRIGONIBLANK, M.F.; MORENO, M.P.N.; MARCHIORO, M.; ANTONIOLLI, A.R. Antinociceptive and antiedematogenic effects of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* leaves in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**. 76, n.1, p.81-86, 2001.
- BITTENCOURT, L.S.; ZEIDÁN-CHULIÁ, F.; YATSU, F.K.J.; SCHNORR, C.E.; MORESCO, K.S.; KOLLING, E.A.; GELAIN, D.P.; BASSANI, V.L.; MOREIRA, J.C.F. Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) prevents β -amyloid aggregation, generation of advanced glycation-end products (AGEs), and acrolein-induced cytotoxicity on human neuronal-like cells. **Phytother. Res.**, 28, 1615–1624, 2014.

BLUMENTHAL, M. **The complete German commission and monographs. Therapeutic guide to herbal medicines.** Austin, Texas, Integrative Medicine Communications. 2000.

BOALINO, D.M.; CONNOLLY, J.D.; MCLEAN, S.; REYNOLDS, W.F.; TINTO, W.F. α -Pyrones and a 2(5H)-furanone from *Hyptis pectinata*. **Phytochemistry**, 64: 1303-7. 2003.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Resolução de Diretoria Colegiada nº 26 de 13 de maio de 2014.** Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos.. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 13 de maio de 2014.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003.**

BUENO, A.X. **Efeitos do extrato aquoso obtidos das folhas da *Hyptis pectinata* (sambacaitá) sobre o Sistema nervoso Central de roedores.** São Cristovão : Programa de Pós-Graduação Medicina da UFS, 2005. Dissertação de Mestrado.

CAETANO, N.; SARAIVA, A.; PEREIRA, R.; CARVALHO, D.; PIMENTEL, M.C.B.; MAIA, M.B.S. Determinação de atividades antimicrobiana de extratos de plantas de uso popular como anti-inflamatório. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v:12(132-135), 2002.

CHUNG, S.K.; OSAWA T.; KAWAKISKI, S. Hydroxy radical scavenging effects of spices and acavengers from brown mustard (*Brassica nigra*). **Bioscience Biothechnology and Biochemistry**, v. 61, p. 118-123, 1997.

CUNHA, F.P.; COSTA, L.J.L.; FERNANDES, A.J.D.; SOUZA, T.P.; SOARES, L.A.L. Development and optimization of extractives from *Astronium urundeuva* (alemão) Engl. by factorial design. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 647-652, 2009.

COLE, M.D. Key antifungal, antibacterial and anti-insect assays-a critical review. **Biochem. System. Ecol.**, v. 22, n. 8, p. 837-856, 1994.

DE SOUZA, T.P.; GOMEZ-AMOZA, J.L.; MARTINEZ-PACHECO, R.; PETROVICK, P.R. Compressional behavior of formulations from *Phyllanthus niruri* spray dried extract. **Die Pharmazie**, 61: 213-217, 2006.

DE SOUZA, T.P.; LIONZO, M.I.Z.; PETROVICK, P.R. Avaliação da redução da carga microbiana de droga vegetal através do processamento tecnológico: decocção e secagem por aspersão. **Rev Bras Farmacogn**, 16: 94-98, 2006.

DAVIES, S.S.; GUO, L. Lipid peroxidation generates biologically active phospholipids including oxidatively N-modified phospholipids. Review. **Chem. Phys. Lipids**, 181, 1–33, 2014.

DRESCH, M.T.; ROSSATO, S.B.; KAPPEL, V.D.; BIEGELMEYER, R.; HOFF, M.L.; Mayorga, P.; ZUANAZZI, J.A.; HENRIQUES, A.T.; MOREIRA, J.C. Optimization and validation of an alternative method to evaluate total reactive antioxidant potential. **Anal. Biochem.**, 385, 107–114, 2009.

FINTELMANN, V.; WEISS, R. F. **Manual de fitoterapia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 526 p, 2010.

FOGLIO, M. A. *et al.* Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. **Construindo a história dos produtos naturais**, 2006.

FOOD and DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for Industry: Botanical Drugs Products**. Rockville: USA, FDA, 2000.

FRAGOSO-SERRANO, M.; GIBBONS, S.; PEREDA-MIRANDA, R. Anti-Staphylococcal and Cytotoxic Compounds from *Hyptis pectinata*. **Planta Medica**, v. 71, p. 278-280, 2005.

GUARDIA, T.; ROTELLI, A. E.; JUAREZ, A. Q.; PELZER, L. E., Anti-inflammatory properties os plant flavonoids. Effect of rutin, quercetin and hiperidin on adjuvant arthritis in rat. II **Pharmacology**, v. 56, p. 683-687, 2001.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C **Free Radicals in Biology and Medicine**, Ed 4. Clarendon Press, Oxford, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radical in Biology and Medicine**. Ed 3. Oxford: Oxford University, 2007.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochem. Soc. Trans.**, 35, 1147–1150, 2007.

HOLLMAN, P. C.; VAN TRIPP, J.; BUYSMAN, M. N.; VAN DER GAAG, M. S.; MENGELERS, M. B., Relative Bioavailability of the flavonóide quercetin from various foods in man. **Federation of European Biochemical Societies letters**. n. 418, p. 152-156, 1995.

HOLLMAN, P. C. H.; HERTOOG, M. G. L.; KATAK, M. B., Analysis and health effects of flavonoids. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 57. n. 1, p. 43-46, 1996.

HUYNH, K.; BERNARDO, B.C.; MCMULLEN, J.R.; RITCHIE, R.H. Diabetic cardiomyopathy: Mechanisms and new treatment strategies targeting antioxidant signaling pathways. **Pharmacol. Ther.**, 142, 375–415 2014.

International Conference on Harmonization. **Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology**. Rockville: FDA, 2005.

LISBOA, A.C.C.D.; MELLO, I.C.M.; NUNES, R.S.; DOS SANTOS, M.A.; ANTONIOLLI, A.R.; MARÇAL, R.M.; CAVALCANTI, S.C.H. Antinociceptive effect of *Hyptis pectinata* leaves extracts. **Fitoterapia**, v.77, p.439–442, 2006.

LISSI, E.A.; SALIM-HANNA, M.; PASCUAL, C.; DEL CASTILLO, M.D. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR) from luminol enhanced chemiluminescence measurements. **Free Radic. Biol. Med.**, 18, 153–158, 1995.

LÓPEZ-ALARCÓN, C.; DENICOLA, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. **Anal. Chim. Acta**, 763, 1–10, 2013.

MALAN, K.; PELISSIER, Y.; MARION, C.; BLAISE, A.; BESSIERE, J.M. The essential oil of *Hyptis pectinata*. **Planta Medica**, v. 54, n.6, p. 531-532, 1988.

MATOS, L.G.; SANTOS, L.D.A.R.; VILELA, C.F.; PONTES, I.S.; TRESVENZOL, L.M.F.; PAULA, J.R.; COSTA, E.A. Atividades analgésica e/ou anti-inflamatória da fração aquosa do extrato etanólico das folhas da *Spiranthera odoratissima* A. St. Hillaire (manacá). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, p. 15-16, 2003.

MELO, G.B.; SILVA, R.L.; MELO, V.A.; ANTONIOLLI, A. R.; JORDANI SOUZA, M.E. Effect of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* on liver mitochondrial respiration. **Phytomedicine**, v.12, p. 359–362, 2005.

MIGLIATO K. F.; MOREIRA R. R. D.; MELLO J. C. P.; SACRAMENTO L. V. S.; CORRÊA M. A.; SALGADO H. R. N. Controle da qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 94-101, 2007.

MIOTO, R. País deixa de gerar US\$ 5 bi por ano com fitoterápicos. **Folha de São Paulo**. São Paulo, 2010. Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/ciencia/746386-paisdeixa-de-gerar-us-5-bi-por-ano-com-fitoterapicos.shtml>>.

MONTEZANO, A.C.; TOUYZ, R.M. Review: Molecular mechanisms of hypertension—Reactive oxygen species and antioxidants: A basic science update for the clinician. **Can. J. Cardiol.**, 28, 288–295, 2012.

MONTGOMERY, D.C. **Diseño y análisis de experimentos**. México: Iberoamérica, 2005.

MOURE, A.; CRUS, J. M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUES, M.; SINEIRO, J., DOMÍGUES, H.; NÚÑEZ, M. J.; PARAJO, J. C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v. 72, p. 145-171, 2001.

NASCIMENTO, G.G.F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C.; SILVA, G.L. Antibacterial activity of plant and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Braz J Microbiol**, 31: 247-256, 2000.

NARDINI, M.; PISU, P.; GENTILI, V.; NATELLA, F.; Di FELICE, M.; PICCOLELLA, E.; SCACCINI, C. Effect of caffeic acid on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress in U937. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v.25, n.9, p.1098-1105, 1998.

OHKOWA, M.; OHISI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351-358, 1979.

PATHIRANA, M.G.M.; GUPTA, B.K. Determination of angle of repose by shadow tracing method. **Canadian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 1, p. 30-32, 1976.

OKEKE, I.N.; LAMIKANRA A. EDELMAN, R. Socioeconomic and behavioral factors leading to acquired bacterial resistance to antibiotics in developing countries. **Emerg Infect Dis.** 5: 18-27, 1999.

OSTROSKY, E.A. *et al.* Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 18, p. 301-307, 2008.

PETRY, R.D.; DE SOUZA, K.C.B.; BASSANI, V.L.; PETROVICK, P.R.; GONZÁLEZ-ORTEGA, G. Doseamento do teor de flavonóides totais em extratos hidroalcoólicos de *Passiflora alata* Dryander (maracujá). **Revista Brasileira de Farmácia**. v, 79, n. 1-2, p. 7-10, 1998.

PULLA REDDY, A.C.; LOKESH, B.R. Studies on spice principles as antioxidants in the inhibition of lipid peroxidation of rat liver microsomes. **Molecular and Cellular Biochemistry**, Norwell, v.111, n.1/2,p.117-124, 1992.

RAMOS, C.S; SILVA, F.A. **Desenvolvimento, padronização e avaliação da atividade antioxidante in vitro de Hyptis pectinata**. IN: I Encontro de Iniciação em Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Universidade Federal de Sergipe, 22 a 23 de outubro de 2009.

ROJAS, A.; HERNANDEZ, L.; PEREDA-MIRANDA, R.; MATA R. Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 35, n. 3, p. 275-283, 1992.

RUBERTO G.; BARATTA M.T.; DEANS S.G.; DORMAN H.J. Antioxidant and antimicrobial activity of *Foeniculum vulgare* and *Crithmum maritimum* essential oils. **Planta Medica**, v. 66, n. 8, p. 687-93, 2000.

SILVA, R.L.; MELO, G.B.; ANTONIOLLI, A.R.; LIMA, S.O.; MELO, V.A.; RAMALHO, F.S.; RAMALHO, L.N.Z.; ZUCOLOTO, S.; JÚNIOR, O.C.S. Efeito do extrato aquoso da *Hyptis pectinata* sobre a proliferação de hepatócitos após hepatectomia parcial. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, s. 3, p. 101-105, 2002.

- SILVA, E.G.; BEHR, G.A.; ZANOTTO-FILHO, A.; LORENZI, R.; PASQUALI, M.A.; RAVAZOLO, L.G.; BORDIGNON, C.L. Jr.; SILVA, F.A.; ABOY, A.L.; BASSANI, V.L.; REGINATTO, F.H.; DAL-PIZZOL, F.; MOREIRA, J.C. Antioxidant activities and free radical scavenging potential of *Bauhinia microstachya*(RADDI) MACBR (Caesalpinaceae) extracts linked to their polyphenol content. **Biol. Pharm. Bull.** 30, 1488–1496. 2007.
- SOARES, L.A.L.; GONZÁLEZ ORTEGA, G; BASSANI, V.L; PETROVICK, P.R. Desenvolvimento tecnológico de soluções extrativas aquosas de *Phyllanthus niruri* L. (quebra-pedra) empregando planejamento fatorial. **Caderno de Farmácia**, v. 14, n. 1/2, p. 21-26, 1998.
- SOUZA, J.D.S.; FERREIRA, W.M. O papel da vitamina e na nutrição e reprodução animal - meios de defesa contra os radicais livres. **Rev Eletr Nutr.**, 4(3):456-61, 2007.
- SOLER-RIVAS, C.; ESPIN, J.C.; WICHERS, H.J. **Phytochemical Analysis**. v.11, n.1. 2000.
- Souza VC, Lorenzi H 2005. **Botânica Sistemática**. Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em *APG II*. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum.
- VERDI, L.G.; BRIGHENTE, I.M.C.; PIZZOLATTI, M.G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Quim Nova**, 28: 85-94, 2005.
- VIEIRA, O.; LARANJINHA, J.; MADEIRA, V .; ALMEIDA, L. Cholesteryl ester hydroperoxide formation in myoglobin-catalyzed low density lipoprotein oxidation: concerted antioxidant activity of caffeic and p-coumaric acids with ascorbate. **Biochemical Pharmacology, London**, v.55, n.3, p.333-340, 1998.
- WORLD Health Organization. Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials. Geneve: **WHO**, 1998.
- WU, J.Q.; KOSTEN, T.R.; ZHANG, X.Y. Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. **Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry**, 46, 200–206, 2013.
- YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; FILHO, V.C. Fármacos e Fitoterápicos: A necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**. V. 24, n. 1 p. 147-152, 2001.

8. Anexos

8.1. Anexo 1: Trabalho apresentado no Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil em 16 a 19 de setembro de 2014



Hyptis pectinata (L.): extrato seco por aspersão e perfil antioxidante *in vitro*

Anderson R. Santos¹; Leonardo B. Bittencourt²; Bruno B. Lima³; Itana B. Scher⁴; Lorena S. Souza⁵; Mara Z. Almeida⁶; Luiz Alberto L. Soares⁴; Lívio César G. Nunes⁷; José C. F. Moreira⁸; Daniel P. Gelain⁹; Adriano A.S. Araújo¹; Francilene A. Silva^{1*}

¹Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais e Fitoterápicos, Departamento de Farmácia, UFRJ-RJ; ²Centro de Estudos em Saúde Coletiva, Departamento de Biologia, UFRJ-RJ; ³Farmácia da Terra, Faculdade de Farmácia, UFRJ-RJ; ⁴Núcleo de Desenvolvimento Analítico e Tecnológico de Fitoterápicos, Departamento de Farmácia, UFRJ-RJ; ⁵Curso de Farmácia UFRJ-RJ

*e-mail: francilene@bomali.com



Introdução

Hyptis pectinata L. Poit. (Lamiaceae), conhecida popularmente como sambacatã ou canudinho, é frequentemente utilizada pelas comunidades das regiões de Sergipe e Alagoas (Brasil) sob a forma de chás (decocto ou infusão) e bochechos como anti-inflamatório natural. A infusão das folhas frescas tem indicação para o tratamento de distúrbios gastrointestinais, inflamação, condições dolorosas orofaciais e cicatrização de feridas. Pesquisas realizadas por nosso grupo reportam as atividades anti-inflamatória e antimicrobiana para a espécie. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de extrato seco por aspersão, das folhas de *H. pectinata* e o estudo de suas propriedades antioxidantes *in vitro*.



Resultados e Discussão

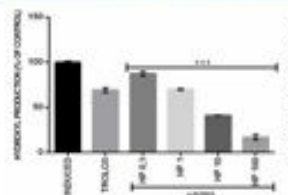


Figura 1. Atividade scavenger de radical hidroxila de ESHP. Os valores representam média \pm SD, experimentos em triplicata. *** $p < 0,001$ diferente do sistema (ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

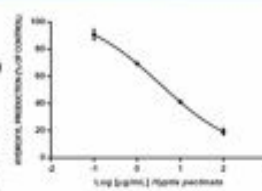


Figura 2. IC50 para a produção de radical hidroxila.

Material e Métodos

Amostra

A solução extrativa de *H. pectinata* foi preparada por decoção em etanol a 50% (v/v) (7,5% m/v) durante 15 min. O extrato foi seco por nebulização (Mini Spray Dryer Büchi 190) empregando Aerosil® como adjuvante de secagem.

Ensaio da atividade scavenger de radicais hidroxila (•OH)

Os radicais hidroxila foram gerados por um sistema de Fenton ($\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}_2$). Quando exposta a radicais hidroxila, a açúcar desoxirribose (DR) é degradada a malondialdeído, o qual gera um cromógeno rosa por aquecimento com ácido tiobarbitúrico (TBA), a um pH baixo.

Medida da lipoperoxidação (TBARS) *in vitro*

Teste TBARS (espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico) foi utilizado para quantificar a peroxidação lipídica. Para o ensaio, foi empregada como fonte de lipídios homogeneizados de gema de ovo (RUBERTO et al., 2000). Os resultados foram expressos em percentagem da formação de TBARS por AAPH sozinho (controle induzido).

Ensaio da atividade scavenger de óxido nítrico (•NO)

O óxido nítrico foi gerado a partir de nitroprussiato de sódio e mediado pela reação de Griess. O nitroprussiato de sódio em solução aquosa a pH fisiológico gera espontaneamente o óxido nítrico, que interage com o oxigênio para produzir íons nítrico que podem ser produzidos utilizando o reagente de Griess. Catadores de óxido nítrico competem com o oxigênio que conduz. A absorbância do cromóforo formado foi medida a 546 nm.

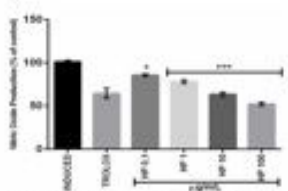


Figura 3. Atividade scavenger de radical de óxido nítrico de ESHP. Os valores representam média \pm SD, experimentos em triplicata. *** $p < 0,001$ diferente do sistema (ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

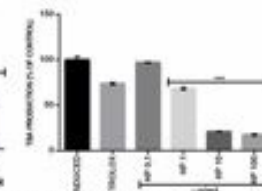


Figura 4. Porcentagem de peroxidação lipídica. Os valores representam média \pm SD, experimentos em triplicata. *** $p < 0,001$ diferente do sistema (ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

Nas concentrações de 0,1; 1; 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$ foi observado que o ESHP preveniu a peroxidação lipídica induzida por AAPH, inibindo a quantidade de TBARS formada, de maneira semelhante ou superior ao controle Trolox. Além disso, o ESHP também reduziu a produção do radical hidroxila, assim como a produção de nitrato de forma semelhante ou superior ao Trolox.

Conclusão

Nossos resultados indicam que o extrato de *H. pectinata* exerce um grande potencial antioxidante *in vitro* por mecanismos químicos ainda não elucidados.

Apoio



8.2. Anexo 2: Trabalho apresentado na Reunião Anual e Exposição da American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS) em San Diego no período de 2 a 6 de novembro de 2014

